

УДК 615.9:616.8-092.9:591.8

Якимова Наталья Леонидовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины,
Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
ynl-77@list.ru

Соседова Лариса Михайловна

доктор медицинских наук, профессор,
заведующая лабораторией биомоделирования
и трансляционной медицины,
Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
sosedlar@mail.ru

Титов Евгений Алексеевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины,
Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
g57097@yandex.ru

Лизарев Александр Викторович

кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины,
Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
lizarev1952@mail.ru

Natalya L. Yakimova

candidate of biological sciences, senior researcher in the laboratory of biomodeling and translational medicine,
East Siberian Institute of Medical and Environmental Research
ynl-77@list.ru

Larisa M. Sosedova

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Biomodeling Laboratory
and translational medicine,
East Siberian Institute of Medical and Environmental Research
sosedlar@mail.ru

Evgeny A. Titov

candidate of biological sciences, senior researcher in the laboratory of biomodeling and translational medicine,
East Siberian Institute of Medical and Environmental Research
g57097@yandex.ru

Alexander V. Lizarev

candidate of medical sciences, associate researcher in the laboratory of biomodeling and translational medicine,
East Siberian Institute of Medical and Environmental Research
lizarev1952@mail.ru

Отдаленные нейротоксические эффекты воздействия свинца в эксперименте

Delayed neurotoxic effects of lead exposure in an experiment

Аннотация: У крыс в условиях моделирования длительной свинцовой интоксикации установлено стойкое нарушение поведения в стрессовой ситуации, дисбаланс в быстроволновых диапазонах фоновой ритмической активности головного мозга. В раннем периоде после интоксикации определялись расширенные периваскулярные пространства, снижение количества нормальных нейронов, увеличение актов нейронофагии, значительное увеличение числа нейронов с экспрессией белков каспазы 3, bcl-2 и белка теплового шока 70. В отдаленном постконтактном периоде воздействия свинца у крыс уменьшилась выраженность морфологических изменений, не наблюдалось нарушений микроциркуляции и экспрессии белка теплового шока 70 в головном мозге. Но, длительно сохранялось неадекватное поведение в условиях стресса в тесте экстраполяционного избегания.

Ключевые слова: отдаленный период; свинец; нервная система; поведение; биоэлектрическая активность; морфологические нарушения

Annotation: In rats, the simulation conditions for long-term lead intoxication show a persistent stress disorder, an imbalance in the rapid wave range of the brain background rhythm activity. In the early post-intoxication period, extended perivascular spaces, a decrease in the number of normal neurons, an increase in the number of neuronophagia acts, a significant increase in the number of neurons with expression of caspase 3, bcl-2 and a heat shock protein 70 were determined. In the remote post-exposure period of exposure to lead in rats, there was less morphological variation, no microcirculation disturbance, and no expression of heat shock protein 70 in the brain. But, for a long time, inappropriate behavior under stress in an extrapolation escape task continued.

Keywords: remote period; lead; nervous system; behaviour; bioelectrical activity; morphological disorders

Нарастающее накопление свинца в объектах окружающей среды не позволяет ослабить внимание к вопросам влияния его на здоровье человека. Длительно сохраняясь в почве, растениях, организме животных, свинец может при вдыхании или путем миграции по трофическим цепям накапливаться в организме. К настоящему времени установлены основные точки приложения и механизм его действия. Несмотря на то, что свинец является полиорганным токсикантом, одним из наиболее частых и выраженных считается поражение нервной системы (НС). Длительный контакт со свинцом приводит к росту содержания свинца в клетках НС, замещению им кальция в карбоксильных соединениях с протеинами, к снижению уровня нейротрансмиттеров, что изменяет синаптическую

передачу нервных импульсов и может приводить к необратимым изменениям в НС [11,12]. В последние годы активно изучается отдаленное влияние свинца на потомство [2,8]. Вместе с тем, остаются малоизученными вопросы отдаленных последствий у лиц со свинцовой интоксикацией в постконтактном периоде. В клинической практике крайне редко наблюдается регрессирование признаков интоксикации с течением времени, наоборот, часто встречается прогрессивное течение интоксикаций [10]. При этом не выяснен механизм прогрессирования нарушений со стороны НС, морфологический субстрат, лежащий в их основе. Правильно спланированное и выполненное экспериментальное моделирование дает возможность оценить биологическую ответную реакцию организма на воздействие токсикантов, исключив влияние различных сопутствующих факторов.

С учетом этого целью настоящих исследований явилось изучение поведенческих реакций, биоэлектрической активности головного мозга и морфологических изменений нервной ткани у крыс в раннем и отдаленном постконтактном периоде свинцовой интоксикации.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на базе вивария ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», на беспородных половозрелых крысах-самцах, массой 240- 280г. Исследования на животных были проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986), «Правил лабораторной практики» (приказ Минздравсоцразвития от 23 августа 2010 г. № 708н). На проведение экспериментов было получено разрешение Локального этического комитета (Протокол № 5 от 14.11.2012).

Интоксикацию вызывали у 32 животных путем запаивания с питьевой водой ацетата свинца в дозе 70,5 мг/кг в сутки в течение 30 дней. Контрольные крысы (n=32) содержались в аналогичных условиях вивария и получали питьевую воду. Обследование крыс проводили дважды: сразу после окончания воздействия свинца (ранний срок обследования) и спустя 9 недель (отдаленный срок обследования). Поведение животных в стрессовой ситуации изучали с помощью теста экстраполяционного избавления (ТЭИ) по способности подныривания в течение 2 мин. под край узкого цилиндра, заполненного водой. Исследование ритмической электрической активности коры головного мозга (ЭЭГ) животных проводили с использованием комплекса «Нейрон-Спектр - 4» (ООО «Нейрософт», Россия). Стереотаксические манипуляции выполняли под анестезией (кетамин внутривенно 0,15 мл/100г, рометар внутривенно 0,075 мл/100г массы). Электроды вживляли в сенсомоторную и зрительную зоны коры головного мозга крыс. Индифферентный электрод вживляли в носовые кости. Регистрацию фоновой ЭЭГ и анализ распределения основных диапазонов проводили на

3-4 день после вживления электродов в условиях свободного поведения особей.

Для морфологического исследования головной мозг от каждого исследуемого животного был извлечен, фиксирован в нейтральном буферном растворе формалина, обезвожен этанолом восходящей концентрации и помещен в гомогенизированную парафиновую среду - HistoMix (BioVitrum, Россия). С помощью микротомы НМ 400 (Microm, Германия) готовили послойные серийные срезы сенсомоторной коры головного мозга в височно-теменной и затылочной долях ткани головного мозга с шагом в 5 микрон: фронтальные срезы от Bregma 1,60 до Bregma -14,60, сагитальные от Lateral 0,40 до Lateral 4,60, горизонтальные от Bregma -3,10, Interaural 6,90 до Bregma -9,60 Interaural 0,40. Для обзорной микроскопии срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для визуализации нервных клеток проводили окраску по Нисслю. Для определения активности проапоптотического белка caspase 3, антиапоптотического белка - bcl-2 и БТШ-70 (белок теплового шока) применяли иммуногистохимический метод. Срезы окрашивали на антитела к изучаемым белкам (Monosan, Нидерланды) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Просмотр срезов осуществляли при помощи светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония). Анализ фотоматериалов выполняли при помощи системы Image Score S. по общему количеству нейронов на единицу площади, количеству темных нейронов и числу нормальных нейронов с экспрессией и без экспрессии изучаемых белков. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft, США). Проверку нормальности распределения количественных признаков выполняли с применением критерия Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методу Манна - Уитни. Достигнутым уровнем значимости различия признаков считали $p < 0,05$.

Результаты исследований.

В стрессовой ситуации крысы со свинцовой интоксикацией не адекватно реагировали на поставленную задачу. В ранний срок обследования в опытной группе только половина особей поднырнула под край цилиндра в ТЭИ, тогда как в контрольной группе это сделало подавляющее большинство животных (14 из 16 крыс) (рис. 1).

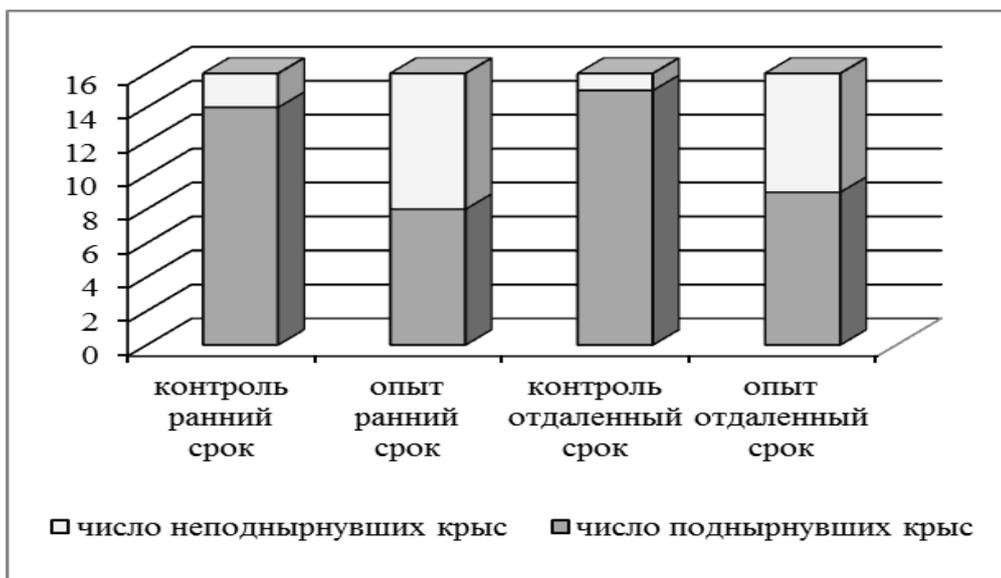


Рис.1. Результаты тестирования крыс в тесте экстраполяционного избавления в динамике постконтактного периода воздействия ацетата свинца.

Спустя 9 недель в отдаленном периоде обследования с задачей теста, по-прежнему, не смогли справиться 43,7 % животных со свинцовой интоксикацией и всего лишь 6,3 % контрольных крыс.

В ранний срок обследования в ЭЭГ крыс после воздействия ацетата свинца наблюдалось 1,5 - кратное увеличение доли $\beta 2$ - ритма по сравнению с контролем (рис. 2).

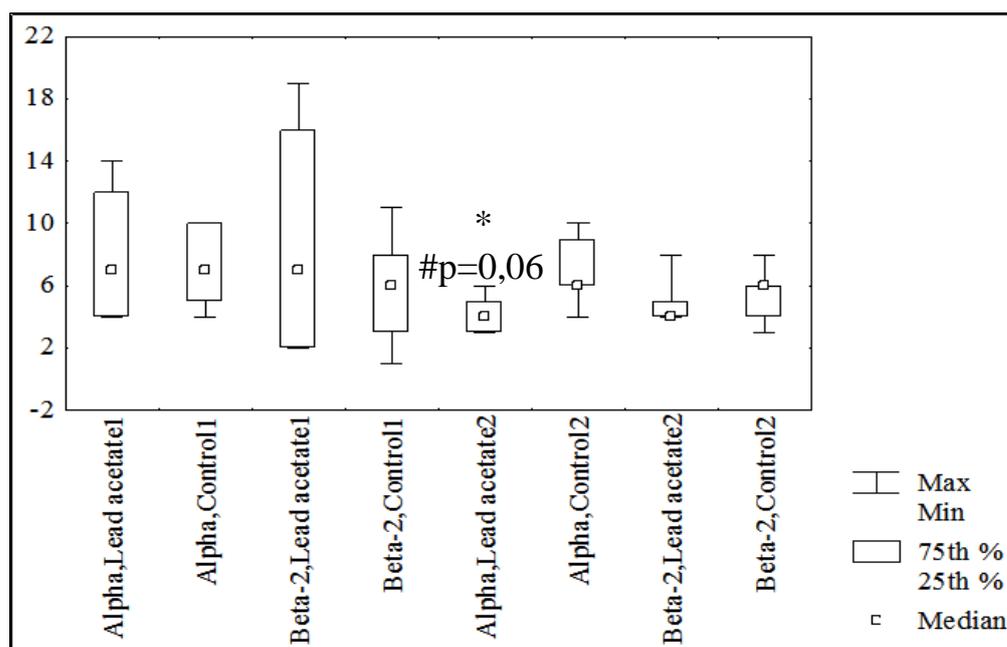


Рис. 2. Распределение ритмов фоновой активности ЭЭГ у крыс в динамике постконтактного периода воздействия ацетата свинца. Примечание: Alpha - альфа ритм; Beta - 2 - бета-2 ритм; Lead acetate - группы животных со свинцовой интоксикацией; Control - группы контрольных животных. 1 - ранний срок, 2 - отдаленный срок. * - различия значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$; # - тенденция по сравнению с ранним сроком. В группах число животных равно 8.

В отдаленном периоде у крыс со свинцовой интоксикацией индекс α - ритма - 4,00 (3,00 - 5,00)% уменьшился, как по отношению к аналогичному показателю контрольной группы - 6,00 (6,00 - 9,00)%, ($p=0,04$), так и по сравнению с ранним сроком обследования - 7,00 (4,00 - 12,00)% ($p=0,06$).

Морфологическое обследование структур нервной ткани сразу после экспозиции свинцом позволило у животных выявить выраженное снижение общего числа нормальных нейронов в ткани головного мозга 174,80 (107,00 - 254,00), по сравнению с контролем 206,00 (195,00 - 215,00) ($p=0,03$). При этом число клеток глии не имело различий в опытной и в контрольной группах. У особей опытной группы чаще встречались процессы утилизации погибших нейронов (нейронофагия) из ткани головного мозга 7,70 (4,00 - 11,00) по сравнению с контрольным значением 2,80 (1,00 - 6,00) ($p=0,01$). Однако, по числу дегенеративно измененных темных нейронов без четко делимого ядра и цитоплазмы опытная и контрольная группа между собой не различались.

При обзорной микроскопии в ткани головного мозга в ранний срок обследования у животных со свинцовой экспозицией обнаруживались расширенные периваскулярные пространства с формированием криблор и диапедез эритроцитов в эти пространства. В отдаленном постконтактном периоде у крыс опытной группы выявлено выраженное снижение общего числа нейронов до 174,00 (143,00 - 237,00) по сравнению с 238,20 (190,00 - 330,00) в контрольной группе ($p=0,03$). Других изменений в гистологической структуре нервной ткани, отличных от контрольной группы не выявлено.

С учетом значительного снижения общего числа нормальных нейронов на единицу площади представляло интерес проведение иммуногистохимического анализа, позволяющего определить механизм гибели клеток. Установлено, что в ранний период обследования резко увеличилось (в 12 раз) по сравнению с контрольной группой число нейронов с экспрессией проапоптотического белка каспазы 3. Одновременно с этим, возросло до 11,5 раз количество нейронов с экспрессией антиапоптотического белка bcl-2 и белка теплового шока-70 (в 29 раз). Однако, в отдаленный период число нейронов с экспрессией к изучаемым белкам каспазы 3, bcl-2 и БТШ -70 статистически значимо не отличалось от показателей контрольной группы.

Обсуждение результатов

Анализ результатов исследований выявил нарушение поведения животных со свинцовой интоксикацией в стрессовой ситуации. Изменения адекватного видоспецифического поведения крыс при воздействии свинца могут быть обусловлены нарушением образования в НС комплекса временных условных связей [1], снижением уровней катехоламинов и серотонина в головном мозге [15], что сопровождается нарушением поведения животных, увеличивая уровень тревожности [5,14]. Нарушение способности крыс к подныриванию под край цилиндра сохранялось в наших экспериментах до 9 недель, что соответствует примерно 10-15 годам жизни человека. Следовательно, воздействие свинца приводит к сохранению нарушений поведения животных в отдаленном постконтактном периоде. Рыжавский Б.Я. и соавт. (2013) предположили, что обусловленный свинцом окислительный стресс в мозге может принимать затяжную форму с сохранением признаков стресса после прекращения введения свинца [7].

Изменение структуры видоспецифического поведения крыс при воздействии свинца подтверждалось и нарушением биоэлектрической активности головного мозга на протяжении всего постконтактного периода. Снижение в динамике постконтактного периода мощности α - диапазона может свидетельствовать о нарушении функционально-восстановительных возможностей нервной системы животных, а также о негативном эмоциональном состоянии, что подтверждается депрессивным поведением половины опытных животных. Наблюдавшееся при обследовании сразу после экспозиции свинцом усиление β_2 - активности, обусловлено, по нашему мнению, микроструктурными диффузными изменениями в мозге вследствие токсического воздействия свинца. Именно в ранний период после воздействия ацетата свинца у крыс выявлялось расширение периваскулярных пространств с формированием криблур и диапедез эритроцитов в эти пространства. Изменение мощности β_2 - диапазона в отдаленном периоде не встречалось, как и нарушение микроциркуляции в ткани головного мозга. Вместе с тем, гистологический анализ показал, что воздействие ацетата свинца на организм крыс характеризуется снижением числа нормальных нейронов в височной и затылочной долях ткани головного мозга, при этом данная направленность сохраняется и в отдаленном постконтактном периоде. В работе Егоровой М.В. (2016) показано снижение числа корзинчатых и звездчатых нейронов в молекулярном слое коры мозжечка [4], Шубиной О.С. с соавт. (2015) выявлено повреждение нейронов соматосенсорной коры головного мозга экспериментальных животных, получивших ацетат свинца [9]. Подтверждение структурных нарушений тканей головного мозга при обследовании в ранний период после воздействия свинца представлено во многих исследованиях [3,6,7].

Увеличение количества нейронов с экспрессией проапоптотического белка каспаза 3, антиапоптотического белка bcl-2, а также резкое снижение

числа нормальных нейронов в раннем периоде обследования крыс свидетельствует о нарастании патологического процесса программируемой клеточной гибели. Одновременное повышение активности данных белков характерно для митохондриального пути формирования апоптоза. При этом выявленное снижение общего числа нейронов позволяет высказать предположение, что клеточная гибель обусловлена апоптотическим процессом. Активацию апоптоза подтверждает и повышение экспрессии белка БТШ-70, т.к. показано его антиапоптотическое действие, опосредованное подавлением стресс-индуцируемого JNK-киназного каскада [13]. Вместе с тем в отдаленном периоде обследования не наблюдалось повышение экспрессии белков апоптоза и БТШ-70, однако сохранялось снижение количества нейронов на единицу площади, что позволяет говорить о других механизмах клеточной гибели.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о длительно сохраняющихся в постконтактном периоде неблагоприятных эффектах свинца, обусловленные незначительной его элиминацией из организма, и характеризующиеся проявлением нарушений видоспецифического поведения животных, дисбалансом биоэлектрической активности головного мозга и морфологическими изменениями коры головного мозга.

Литература

1. Гамма Т.В., Катюшина О.В., Коренюк И.И., Хусаинов Д.Р., Колотилова О.И., Черетаев И.В. // *Таврический медико-биологический вестник*. 2012. Т. 15. № 1(57). С. 341-344.
2. Грызлова Л.В., Киреева Ю.В., Шубина О.С. // *Успехи современного естествознания*. 2006. № 5. С. 68-68.
3. Дубынин, В.А., Каменский А.А., Сапин М.Р., Сивоглазов В.И. *Регуляторные системы организма человека*. М.: Дрофа, 2010. 365 с.
4. Егорова М.В. // *Е-SCIO*. 2016. № 2(2). С. 41-46.
5. Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // *Доклады Академии наук*. 2016. Т. 468. № 3. С. 348-350.
6. Лях И.В., Шейбак В.М., Дорошенко Е.М., Кремлева О.Е., Горшкова Д.А. // *Проблемы здоровья и экологии*. 2013. № 4(38). С. 104-108.
7. Рыжавский Б.Я., Лебедько О.А., Еременко И.Р., Васильева Е.В., Демидова О.В. // *Дальневосточный медицинский журнал*. 2013. № 4. С. 98-105.
8. Рыжавский Б.Я., Михайлов В.И., Фельдшеров Ю.И., Обухова Г.Г., Березина Г.П., Мальшева Е.Н., Кузнецов С.В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000. № 1. С.28-30.
9. Шубина О.С., Комусова О.И., Тельцов Л.П. // *Морфологические ведомости*. 2015. № 4. С. 38-53.
10. Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla-Vega B. // *Front Cell Neurosci*. 2015. V. 9. P. 1-22.

11. Flora G., Gupta D., Tiwari A. // *Interdiscip. Toxicol.* 2012.V. 5. № 2. P. 47-58.
12. Flora S.J.S., Saxena G., Mehta A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 322. № 1. P.108-116.
13. Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 9. P. 5317-5327.
14. Sansar W., Bouyatas M.M., Ahboucha S. // *Acta Histochem.* 2012. V. 114. № 1. P. 41-45.
15. Saxena G., Flora S.J. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2006. V. 58. № 4. P. 547-559.

Literature

1. Gamma T.V., Katyushina O.V., Korenyuk I.I., Khusainov D.R., Kolotilova O.I., Cheretaev I.V.//*Tauride Medical and Biological Bulletin.* 2012. T. 15. NO. 1 (57). C. 341-344.
2. Gryzlova L.V., Kireeva Yu.V., Shubina O.S.//*Successes of modern natural science.* 2006. № 5. C. 68-68.
3. Dubynin, V.A., Kamensky A.A., Sapin M.R., Sivglazov V.I. *Regulatory systems of the human body. M.: Drofa, 2010. 365 s.*
4. Egorova M.V.//*E-SCIO.* 2016. № 2(2). S. 41-46.
5. Inozemtsev A.N., Bokieva S.B., Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.//*Reports of the Academy of Sciences.* 2016. T. 468. NO. 3. C. 348-350.
6. Lyakh I.V., Sheibak V.M., Doroshenko E.M., Kremlin O.E., Gorshkova D.A.//*Problems of health and ecology.* 2013. № 4(38). S. 104-108.
7. Ryzhavsky B.Ya., Lebedko O.A., Eremenko I.R., Vasilyeva E.V., Demidova O.V.//*Far Eastern Medical Journal.* 2013. № 4. C. 98-105.
8. Ryzhavsky B.Ya., Mikhailov V.I., Paramedics Yu.I., Obukhova G.G., Berezina G.P., Malysheva E.N., Kuznetsov S.V.//*Bulletin of experimental biology and medicine.* 2000. № 1. Page 28-30.
9. Shubina O.S., Komusova O.I., Teltsov L.P.//*Morphological statements.* 2015. № 4. C. 38-53.
10. Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla- Vega B. // *Front Cell Neurosci.* 2015. V. 9. P. 1-22.
11. Flora G., Gupta D., Tiwari A. // *Interdiscip. Toxicol.* 2012.V. 5. № 2. P. 47-58.
12. Flora S.J.S., Saxena G., Mehta A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 322. № 1. P.108-116.
13. Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 9. P. 5317-5327.
14. Sansar W., Bouyatas M.M., Ahboucha S. // *Acta Histochem.* 2012. V. 114. № 1. P. 41-45.
15. Saxena G., Flora S.J. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2006. V. 58. № 4. P. 547-559.